ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ И ОБЩЕТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 001.891:629.783:525+578.0827

ПРОЕКТ «БИОН-М1»: ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ ИТОГИ

Сычев В.Н.[1], Ильин Е.А.[1], Ярманова Е.Н.[1], Раков Д.В.[1], Ушаков И.Б.[1], Кирилин А.Н.[2], Орлов О.И.[1], Григорьев А.И.[1]

[1]Государственный научный центр Российской Федерации – Институт медико-биологических проблем РАН, Москва
[2]Государственный научно-производственный ракетно-космический центр «ЦСКБ-Прогресс», г. Самара
e-mail: bionomy@imbp.ru

В период с 19 апреля по 19 мая 2013 г. состоялся полет биоспутника «Бион-М1». Программа экспериментов и исследований в этом полете в значительной степени является дальнейшим развитием работ по предшествующим 11 проектам «Бион», проектам «Фотон-М2» и «Фотон-М3». На борту биоспутника находились самые разнообразные живые системы для проведения экспериментов и исследований по гравитационной физиологии, гравитационной биологии, биотехнологии, астробиологии, радиационной биологии и радиационной дозиметрии и спектрометрии. Впервые в практике отечественной биологии и физиологии для длительного полетного эксперимента были выбраны мыши-самцы линии C57bl/6, что позволило сделать акцент на проведении молекулярно-биологических исследований. К сожалению, в связи с техническими сбоями в работе бортовой научной аппаратуры часть животных погибла. Однако основные целевые задачи за счет перераспределения биоматериала по различным направлениям исследований удалось выполнить практически в полном объеме.

Ключевые слова: биоспутник «Бион-М1», невесомость, мыши, песчанки, микроорганизмы.

Авиакосмическая и экологическая медицина. 2014. Т. 48. № 1. С. 7–14.

Одной из ключевых задач космической биологии и физиологии является исследование влияния факторов космического полета (КП) и космического пространства на фундаментальные процессы жизнедеятельности с целью создания научной основы для системы медицинского обеспечения КП человека и решения кардинальных проблем наук о жизни на Земле и за ее пределами.

Успешное решение этой задачи стало возможным благодаря созданию ракетно-космической техники, позволившей изучать реакции живых систем в ранее недоступных для исследований условиях. Объектами для такого изучения являются различные виды организмов, в первую очередь человек и животные.

Исследования состояния человека в КП позволили существенно продвинуться в понимании закономерностей и механизмов адаптации к условиям невесомости и в разработке средств и методов профилактики ее неблагоприятных эффектов. Тем не менее эксперименты на животных в КП в нашей стране и за рубежом не утратили своей актуальности в связи с тем, что важные для космической биологии и физиологии исследования могут быть проведены только на животных. К их числу относятся исследования:

– в строго контролируемых условиях для получения чистых научных результатов, не осложненных воздействием на организм психоэмоциональных факторов и средств профилактики;
– на генетически однородных популяциях с возможностью направленной модификации генетического паспорта;
– полного цикла индивидуального развития и отдаленных биологических последствий КП;
– на животных с коротким жизненным циклом для оценки влияния на организм различных этиологических факторов в ряду поколений;
– различных органов и тканей, извлеченных после эвтаназии у животных (комплексные морфологические, биохимические и молекулярно-биологические исследования);
– физиологической и посттравматической регенерации различных тканей организма;
– воздействия на организм экстремальных внешних факторов, которые потенциально могут привести к серьезным повреждениям организма или к его гибели (космическая радиация, гипомагнитная среда, резкие перепады температуры и барометрического давления, нештатные величины перегрузок и т.п.).

Некоторые из перечисленных исследований на животных были проведены в полете орбитального комплекса «Мир» [1], но главным образом осуществлены в полетах 11 биоспутников «Бион»

– автоматических космических аппаратов (КА), специально предназначенных для биологических и физиологических экспериментов [2, 3].

Реализация экспериментов на животных в полетах пилотируемых орбитальных станций, в частности на борту Международной космической станции (МКС), теоретически имеет ряд преимуществ по сравнению с аналогичными экспериментами в полетах автоматических КА. К ним следует отнести возможность:

– проведения экспериментов с длительным (многомесячным) нахождением животных в условиях КП, что практически невозможно при проведении полностью автоматизированных экспериментов на борту беспилотных КА;

– вмешательства космонавта в работу систем содержания и жизнеобеспечения животных (обслуживание, ремонт);

– непосредственного участия космонавта в проведении запланированных экспериментов и исследований;

– принятия оперативных решений и их быстрой реализации в ходе полета;

– плановой эвтаназии животных в ходе полета со взятием органов и тканей для их последующей отправки на Землю с целью осуществления комплексных научных исследований;

– проведения образовательных телерепортажей об экспериментах с животными на борту космического летательного аппарата.

Однако из-за ограниченного объема российского сегмента (РС) в пилотируемых полетах на МКС можно содержать лишь животных, не требующих сложных систем жизнеобеспечения и не загрязняющих среду обитания запахами, химическими токсикантами и твердыми частицами. Проведение экспериментов на млекопитающих (мышах, крысах, обезьянах), т.е. на животных, наиболее близких к человеку по своей анатомии и физиологии, в ближайшие годы на РС МКС по многим, главным образом техническим, причинам исключено. Однако потребность в проведении таких экспериментов в КП существует. Следовательно, другой альтернативы, кроме проведения российских экспериментов с млекопитающими на борту биоспутников «Бион-М», пока нет. Преимуществом проведения биологических и физиологических экспериментов в полетах автоматических (беспилотных) КА является возможность:

– планирования полета (даты запуска, параметров орбиты, продолжительности полета, условий жизнеобеспечения) для решения целей и задач, определенных научной программой;

– проведения экспериментов с опасными для человека воздействиями и методиками исследований (острое или хроническое облучение в повышенных дозах от бортового источника ионизирующего излучения, воздействие газообразных токсикантов в дозах, превышающих ПДК, изотопные исследования, модели острых инфекционных заболеваний);

– принятия решения по ходу проведения экспериментов без согласования с программой полета экипажа в случае проведения экспериментов с животными на борту пилотируемых КА;

– запуска в космос и возвращения на Землю в одном КА большого количества животных, чего нельзя сделать на транспортном корабле «Союз».

Эти преимущества в полной мере проявились при выполнении программы «Бион» в 1973–1997 гг. В экспериментах на животных был получен большой объем научной информации о том, что в условиях невесомости практически во всех физиологических системах организма развиваются структурно-функциональные изменения, большая часть которых после окончания полета сравнительно быстро нормализуется. По мнению исследователей, обнаруженные изменения являются не патологией, а проявлением адаптации к условиям невесомости. Однако с точки зрения нормальной физиологии эти изменения свидетельствуют о развитии в условиях невесомости детренированности организма, и это касается, прежде всего, сердечно-сосудистой, сенсомоторной, мышечной и скелетной систем.

Полученные по программе «Бион» результаты о влиянии невесомости и других факторов КП на фундаментальные процессы жизнедеятельности были использованы при разработке средств профилактики для пилотируемых полетов и медицинском обосновании возможности годового полета человека в ближний космос при сохранении здоровья и высокого уровня работоспособности.

В настоящее время в полетных экспериментах на животных ставятся задачи, направленные на получение новых научных и технологических данных, необходимых для решения медицинских проблем полетов человека в дальний космос [4]. Для реализации такой амбициозной задачи необходимы, на наш взгляд, следующие условия: использование самых современных методов и технологий исследований, широкая научная, в том числе международная, кооперация, создание автоматических КА для полетов как по низким, так и по более высоким орбитам.

Учитывая высокую результативность исследований по программе «Бион», целесообразно в первую очередь возобновить запуски в космос биоспутников для продолжения исследований влияния невесомости на процессы жизнедеятельности в полетах по стандартным орбитам, а затем перейти к запускам КА на высокоапогейные орбиты для изучения комбинированного действия на организм невесомости, повышенных уровней космической радиации, гипомагнитной среды и других факторов КП.

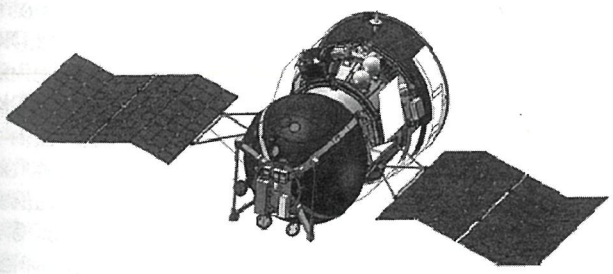
Запуск в космос первого биоспутника серии «Бион-М» через 16 лет после полета биоспутника «Бион-11» явился важным событием в

отечественной и мировой космонавтике и свидетельством признания научно-практической значимости экспериментальных исследований по космической биологии и физиологии.

Создание КА «Бион-М1» было предусмотрено Федеральной космической программой России на период 2005–2015 гг. Разработчиком этого КА, как и предыдущих биоспутников, был Государственный научно-производственный ракетно-космический центр «ЦСКБ-Прогресс» (ГНПРКЦ «ЦСКБ-Прогресс», г. Самара). Ответственным за разработку и реализацию комплексной программы экспериментов и исследований, за создание бортовой научной аппаратуры (НА), отбор и подготовку биообъектов к полету являлся Государственный научный центр РФ – Институт медико-биологических проблем РАН (ГНЦ РФ – ИМБП РАН).

В проведении экспериментальных исследований по проекту «Бион-М1» участвовали специалисты из 70 научных и образовательных учреждений России, а также специалисты зарубежных стран.

Космический аппарат «Бион-М» имеет ряд принципиальных отличий от своего предшественника КА «Бион», что позволяет считать его биоспутником нового поколения. В первую очередь его усовершенствование связано с установкой панелей солнечных батарей, что расширяет возможности использования энергоемкой НА и позволяет увеличить продолжительность КП до 30 и более суток. Важным отличием нового КА является включение в его конструкцию жидкостного двигателя многократного использования, что обеспечивает возможность его вывода на более высокую орбиту. И наконец, в КА «Бион-М» применена новая система поддержания требуемого состава газовой среды на борту с использованием размещаемых снаружи биоспутника баллонов с кислородом под повышенным давлением и фильтров очистки воздушной среды, находящихся внутри него. Внешний вид КА «Бион-М1» приведен на рисунке.



Космический аппарат «Бион-М» (разработчик и изготовитель ГНПРКЦ «ЦСКБ-Прогресс»)

Все биообъекты были доставлены на космодром «Байконур» чартерным рейсом самолета за 7 сут до старта. За 3 сут до старта после выполнения работ по предполетной подготовке биообъектов и НА началось их размещение в спускаемом аппарате (СА) КА «Бион-М1». Старт состоялся 19 апреля 2013 г. в 14:00 (здесь и далее время московское). Максимальная величина перегрузки на активном участке полета составляла 4 g.

Полет КА «Бион-М1» проходил по околокруговой орбите высотой 575 км. Угол наклонения орбиты составлял 64,9°. Все этапы полета КА прошли нормально, в соответствии с намеченным графиком. Параметры воздушной среды на борту биоспутника поддерживались в заданном диапазоне: pO_2 – 150–170 мм рт. ст., CO_2 – в среднем 0,02 мм рт. ст., относительная влажность в среднем 66 %, температура – 20–22 °С.

В связи с существенным повышением высоты орбиты КА «Бион-М1» и соответственно возрастанием интенсивности космического излучения во время полета проводили контроль облучения различных биообъектов, размещенных внутри СА и на его наружной поверхности. По данным В.А. Шуршакова, интегральная поглощенная доза за весь полет в СА изменялась от 32 до 72 мГр в зависимости от места расположения биообъектов, соответствующая мощность дозы составила от 0,5 до 1,25 мГр/сут, что примерно в 6 раз выше, чем на типичной для МКС орбите 400 км. Наибольшая дозовая нагрузка приходилась на биообъекты, размещенные вблизи стенки СА, снижаясь по мере приближения его к центру. Таким образом, доза облучения биообъектов, находившихся в течение месяца внутри КА «Бион-М», примерно равна дозе, получаемой космонавтами МКС за полугодовой полет.

На наружной поверхности СА мощность дозы в полете зависела от места расположения биообъектов в контейнерах НА и изменялась от 0,3 мГр/сут до 0,9 Гр/сут. Таким образом перепад доз снаружи КА достигал ~ 3000 раз, что обусловлено различием толщины и материала экранирующей защиты.

Во время полета биоспутника контроль за работой служебной и научной аппаратуры, снаряженной биообъектами, осуществляли в Центре управления полетами в г. Королеве.

Приземление СА состоялось 19 мая 2013 г., в 7:25, в 120 км юго-западнее г. Оренбурга. Максимальная величина перегрузки при спуске с орбиты составляла 6 g. Поисковая команда прибыла к месту приземления через 13 мин. Извлечение из СА НА с биообъектами началось в 8:55 и закончилось через 3 ч после приземления СА. Работа с биообъектами проводилась сразу после извлечения из СА соответствующей аппаратуры в течение 3 ч.

Транспортировка биообъектов с места приземления СА в Москву заняла 8 ч. В 19:00 все биообъекты были доставлены в лабораторию ГНЦ РФ – ИМБП РАН,

т.е. от момента приземления СА до начала работ с биообъектами прошло менее 12 ч.

Через 3 мес после окончания полета на экспериментально-стендовой базе ГНЦ РФ – ИМБП РАН был начат отставленный контрольный эксперимент с биообъектами, аналогичными полетным, с использованием той же самой НА, что была на борту КА «Бион-М1». Во время 30-суточного контрольного эксперимента воспроизводились те же параметры среды обитания, что и в КП, за исключением содержания CO_2, уровень которой по техническим причинам был несколько выше, но не превышал физиологически значимых величин.

Биообъекты и задачи исследований

Программа фундаментальных и прикладных исследований по проекту «Бион-М1» одобрена решениями Ученого совета ГНЦ РФ – ИМБП РАН, секцией по космической биологии и физиологии Совета РАН по космосу, Комиссией по биомедицинской этике при ГНЦ РФ – ИМБП РАН и утверждена 9.09.2012 г. Председателем Совета РАН по космосу академиком А.Ф. Андреевым.

Исходя из конкретных задач исследований для экспериментов в полете КА «Бион-М1», были выбраны следующие живые системы:

1. Млекопитающие:
   - мыши C57bl/6, свободные от патогенной микрофлоры, в количестве 45 особей, возраст и масса перед полетом – 4–5 мес и 27,4 г соответственно;
   - монгольские песчанки *Meriones ungviculatus* в количестве 8 особей, возраст и масса перед полетом – 5 мес и 59,4 г соответственно.
2. Рептилии: ящерицы-гекконы *Chondrodactylus turneri Gray* в количестве 15 особей, возраст – 1,5–2 года, масса перед полетом – 19–20 г, длина от кончика морды до кончика хвоста – 15–16 см.
3. Рыбы *Oreochromis mossambicus*.
4. Моллюски:
   - виноградные улитки *Lucorum taurica и Helix lucorum caucasica*;
   - пресноводные улитки *Biomphalaria glabrata;*
5. Ракообразные:
   - *Hyalella Azteca;*
   - активированные яйца *Artemia salina*.
6. Насекомые: личинки жука-древоточца *Hylotrupes bajulus*.
7. Микроорганизмы: *Thermoanaerobacter siderophilus, Moorella glycerini, Bacillus thermoamylovorans SKC1, Carboxydocella ferrireduca, Archaeoglobus fulgidus, Escherichia coli, Clostridium thermocellum, Trichoderma viride, Bdellovibrio*; микробный комплекс многолетнемерзлого грунта, микробный комплекс почвенного чернозема, грибная культура и грибная споровая масса *Pleurotus ostreatus*.
8. Высшие растения:
   - гаметофоры мха *Physcomitrella patens*;
   - плоды расторопши пятнистой *Silybu marianum*, семена лимонника китайского *Schisand chinensis* и мелиссы лекарственной *Melissa officinal*
   - семена.
9. Низшие растения:
   - водоросли: *Euglena gracilis, Ceratophyllu Anabaena variabilis;*
   - лишайники: *Peltigera aphthosa и Hypogymn physodes.*
10. Биопрепараты: образцы пептидов и нуклеотидов на стеклах.

В отличие от предыдущей программы «Бион» в данном полете впервые для физиологических клеточных и молекулярных исследований был выбраны мыши линии C57bl/6. Ранее мыши это линии использовались при проведении кратковременных полетов (до 1 сут) на советских космических кораблях-спутниках в 1960 г., в 2-недельных полетах «Спейс Шаттл» и в 3-месячном эксперименте на борту МКС, где из 6 мышей выжили 3. Важным отличием эксперимента с мышами в полете «Бион-М1» было то, что впервые в эксперименте использовались самцы, а не самки мышей. Это значительно повышало ценность получаемых результатов, но создавало дополнительные трудности в связи с вероятностью возникновения конфликтов внутри групп.

Анатомия и физиология мышей во-многом такая же, как у человека, к тому же геном мыши на 99 % совпадает с геномом человека. Поэтому линейные мыши являются наиболее подходящими объектами для изучения механизмов адаптации к невесомости на генном, протеомном и клеточном уровнях.

Несмотря на широкий перечень конкретных задач послеполетных исследований на мышах, основным направлением было изучение клеточных и молекулярных механизмов адаптации организма к условиям невесомости, что отличало эти исследования от исследований с участием человека.

К сожалению, во время полета биоспутника «Бион-М1» произошел отказ одного из 3 блоков «БИОС-МЛЖ», в которых находились мыши, поэтому 15 мышей погибли в первые 10 сут полета. Живыми из КП вернулись 16 мышей из 30 оставшихся и находившихся в 2 других блоках «БИОС-МЛЖ». Гибель мышей была вызвана несколькими причинами: сбоями в системе подачи пищи, конфликтами внутри группы, попаданием мышей в движущиеся части кормушки. При проведении наземных биотехнических испытаний блока «БИОС-МЛЖ» ничего подобного не наблюдали.

По оценке российских ветеринаров и главного ветеринара НАСА, входившего в состав группы американских исследователей, состояние вернувшихся из КП мышей было хорошим. Животные были

пригодны для проведения запланированных послеполетных научных исследований.

В соответствии с программой послеполетных исследований 1-ю группу мышей (11 особей) подвергли эвтаназии для проведения гистологических, биохимических, молекулярно-биологических и других исследований практически всех органов и тканей in vitro. На 2-й группе мышей (5 особей) после полета проводили исследования внешнего дыхания, сердечно-сосудистой системы и поведения. На 8-е сутки после полета проведены эвтаназия этой группы животных и взятие органов и тканей для исследований in vitro, в значительной степени повторяющих те, что были выполнены на 1-й группе мышей.

Несмотря на частичную гибель мышей в КП, основные исследования на этих животных выполнены практически в полном объеме, за исключением запланированных на первые часы после приземления.

Другими представителями млекопитающих на борту биоспутника были монгольские песчанки. На этих животных планировалось проведение тех же исследований, что и по проекту 12-суточного полета КА «Фотон-М3» в 2007 г.: видеосъемка их поведения в условиях невесомости и послеполетные морфофункциональные исследования различных физиологических систем организма. Основная цель исследований на песчанках по проекту «Бион-М1» заключалась в сопоставлении результатов исследований после 30-суточного полета с аналогичными результатами после 12-суточного полета и определении влияния длительности пребывания в условиях невесомости на структурно-функциональные изменения в организме. Однако это не удалось реализовать, так как аппаратура «Контур-БМ», в которой находились песчанки, на 7-е сутки полета биоспутника «Бион-М1» вышла из строя.

Такая же участь постигла и НА «Омегахэб», в которой находились рыбы, пресноводные улитки и рачки. На 12-е сутки полета в НА отключилось освещение, фотосинтез водорослей прекратился, в связи с чем все гетеротрофные обитатели микроэкосистемы погибли. Выжили только водоросли, так как Euglena gracilis способна переходить с автотрофного питания на гетеротрофное.

Обширная программа полетных исследований поведенческих реакций с использованием видеорегистрации и послеполетных исследований структурно-функциональных адаптаций к условиям невесомости была успешно реализована на ящерицах-гекконах, которые хорошо перенесли условия КП. В отличие от мышей и песчанок, эти животные большую часть времени проводят в фиксированном положении тела благодаря способности прикрепляться лапами к любой поверхности, независимо от вектора силы тяжести. Эта особенность ящериц-гекконов позволяет оценить видоспецифичность в реакциях различных земных организмов на условия невесомости. На ящерицах-гекконах были успешно проведены эксперименты в полетах КА «Фотон-М2» (2005) и «Фотон-М3» (2007) продолжительностью 14 и 12 сут соответственно [5].

Виноградные улитки, отобранные для эксперимента, хорошо перенесли условия 30-суточного полета на борту биоспутника «Бион-М1». Выбор улиток был обусловлен 2 основными причинами. Во-первых, это классический объект для исследований поведения животных и возбудимости гравирецепторов статоциста – органа ориентации животного в пространстве. Во-вторых, виноградные улитки были использованы в качестве объектов исследований в полетах КА «Фотон-М2» и «Фотон-М3» [6].

Сравнительный анализ результатов однотипных послеполетных исследований на ящерицах-гекконах и улитках по проектам «Фотон-М» и «Бион-М1» позволил оценить биологическую значимость фактора длительности пребывания в условиях невесомости в развитии структурно-функциональных изменений в организме.

Большое количество разнообразных экспериментов было успешно выполнено с культурами микроорганизмов и микробными ассоциациями, которые размещались как внутри КА, так и на его наружной поверхности. Предполагалось, что применение современных молекулярно-генетических методик исследований позволит оценить влияние невесомости, а также комплекса экстремальных факторов открытого космического пространства (ионизирующая радиация, УФ-излучение, вакуум, резкие перепады температуры) на биологические свойства микроорганизмов. Результаты этих исследований могут быть важны для гравитационной биологии, астробиологии, планетарного карантина и биотехнологии.

Традиционными объектами исследований в области гравитационной биологии являются высшие растения. В данном полете изучалось влияние невесомости на химический состав и содержание биологически активных соединений в лекарственных растениях. На лишайниках, культурах протонем мхов и грибах изучали влияние факторов КП на рост и развитие растений и исследовали белковый профиль клеток методами протеомики. Семена высших растений использовали главным образом в качестве индикаторов радиационного воздействия. Все запланированные эксперименты с высшими растениями выполнены в полном объеме.

Научная аппаратура

Из практики проведения биологических экспериментов в КП следует, что успех в реализации научной программы в значительной степени зависит

от надежности работы бортовой НА. Для экспериментов, которые проводятся в полетах автоматических КА, это особенно важно, поскольку отсутствует возможность проведения ремонтных работ в ходе полета.

Если проанализировать историю эксплуатации бортовой НА в полетах 11 биоспутников, можно увидеть, что в 6 полетах возникали те или иные отклонения в ее работе. Наиболее часто наблюдали сбои в работе системы обеспечения крыс и обезьян пастообразным кормом, что в некоторых КП приводило к частичной гибели крыс. Так, в полете биоспутника «Бион-1» (1973) погибли 9 из 45 крыс (20 %), а также произошли серьезные сбои в работе системы регенерации атмосферы, что привело к сокращению запланированной продолжительности полета. Первый полетный эксперимент с обезьянами в 1983 г. тоже был существенно сокращен по продолжительности в связи с повреждением обезьяной системы полужесткой фиксации тела. В полете биоспутника «Бион-8» в 1983 г. произошел отказ в работе системы подачи пастообразного корма одной обезьяне. Случались также сбои в работе оранжереи для выращивания растений и термостатов для экспериментов с тканевыми культурами.

Вышеизложенное свидетельствует, прежде всего, о необходимости проведения более тщательных предполетных наземных испытаний НА. Вероятность отказов в работе полностью автоматизированных бортовых комплексов аппаратуры необходимо также учитывать при разработке программ исследований, имея в виду возможное уменьшение количества животных и других биообъектов.

Первоначально программа экспериментов и исследований по проекту «Бион-М1» была составлена из расчета, что вся бортовая НА будет исправно функционировать. В пользу этого свидетельствовали результаты ее наземных технических и биотехнических испытаний. Однако в ходе КП стало ясно, что это далеко не так. Погибли 29 мышей, поэтому программа исследований на мышах была модифицирована таким образом, чтобы, несмотря на гибель животных в полете, реализовать основные цели и задачи послеполетных исследований.

Полетные эксперименты на мышах и ящерицах-гекконах проводили в НА «БИОС-МЛЖ», разработанной и изготовленной СКТБ «Биофизприбор» Федерального медико-биологического агентства. На борту биоспутника были размещены 3 блока «БИОС-МЛЖ» для содержания 45 мышей (по 15 особей в каждом блоке) и 15 гекконов (по 5 особей в каждой камере с наименованием «БИОС-ГК»). Каждый блок «БИОС-МЛЖ» включал в свой состав 5 камер (клеток), в которых содержалось по 3 мыши, систему подачи пастообразного корма, систему вентиляции и сбора отходов жизнедеятельности, систему освещения, видеорегистраторы поведения животных и систему внутрикабинной телеметрической передачи и регистрации данных об артериальном давлении у 5 мышей, находившихся в одном из блоков «БИОС-МЛЖ».

Камеры цилиндрической формы для содержания мышей имели размеры: длина 200 ± 10 мм, диаметр 98 ± 2 мм. Камеры (клетки) для содержания гекконов были прямоугольной формы объемом 5 л. Принудительная вентиляция камер с мышами осуществлялась непрерывно с 6-кратной сменой воздушных объемов в минуту. Линейная скорость воздушного потока составляла не более 0,3 м/с. Воздушный поток на выходе из клеток с мышами подвергался предварительной очистке от газообразных микропримесей и механических частиц. Вентиляция камер с гекконами была пассивной и проводилась через отверстия в камере.

Освещение в клетках с мышами и гекконами осуществлялось по графику: 12 ч – «день», 12 ч – «ночь». Освещенность желтым светом клетки составляла 45 ± 5 лк в зоне кормушки и 40 ± 5 лк в зоне посадочного люка. Для обеспечения периодической круглосуточной видеосъемки поведения мышей освещенность клетки желтым светом в ночное время поддерживалась на уровне 5 ± 2 лк. Освещенность белым светом в камере с гекконами составляла днем не менее 300 лк и ночью – 5 ± 2 лк, что позволило получить большой объем видеоинформации о поведении животных.

Кормление мышей осуществлялось 6-разовым заполнением пастообразным кормом 5 индивидуальных кормушек блоков «БИОС-МЛЖ» ежесуточно. Кормление гекконов обеспечивалось открыванием кормушек в течение 4 ч через каждые 3 сут.

Информация о работе аппаратуры «БИОС-МЛЖ» ежесуточно передавалась на Землю по каналам телеметрической связи.

Для полетного эксперимента с монгольскими песчанками была использована модернизированная герметично замкнутая НА «Контур-БМ» с автономной системой жизнеобеспечения. Аппаратура была разработана и изготовлена в ЗАО «СКБ ЭО» при ГНЦ РФ – ИМБП РАН в 2007 г. и прошла летно-конструкторские испытания при проведении эксперимента с песчанками в 12-суточном полете КА «Фотон-М3» [7].

В НА «Контур-БМ» на борту биоспутника «Бион-М1» были размещены 8 песчанок. Парциальное давление кислорода в герметичной камере для животных во время КП колебалось в пределах 140–180 мм рт. ст., линейная скорость вентиляции составляла 0,3 м/с, парциальное давление CO_2 достигало 5,3 мм рт. ст. Освещенность в клетке с животными была не менее 5 лк. Для наблюдения за поведением животных снаружи аппаратуры были установлены 3 видеокамеры. Кормление животных осуществлялось брикетированным кормом с

повышенным содержанием влаги. Информация о работе аппаратуры поступала на Землю по каналам телеметрической связи.

Эксперимент с рыбами, водорослями и рачками проводился в НА «Омегахэб», разработанной и изготовленной в Германии.

Виноградные улитки на борту биоспутника «Бион-М1» находились в 2 вентилируемых контейнерах ББ-1М, аналогичных используемым в полетах КА «Фотон-М2» и «Фотон-М3» [6]. Всего в 2 контейнерах было размещено 16 улиток. После полета 15 улиток были в хорошем состоянии, 1 улитка погибла.

Эксперименты с высшими растениями и микроорганизмами проводились главным образом в модифицированной НА «Биоконт-Б» производства ФГУП «ЦНИИмаш» в условиях термостатирования при температуре 26 °С или без термостатирования при температуре 20–22 °С. Указанная аппаратура, прошедшая летно-конструкторские испытания в полетах КА «Фотон-М2» и «Фотон-М3», находилась внутри спускаемого аппарата «Бион-М1».

В контейнерах НА производства ГНПРКЦ «ЦСКБ-Прогресс», которые были установлены на внешней поверхности СА, размещались платы полезной нагрузки (ППН) производства ГНЦ РФ – ИМБП РАН, обеспечивающие проведение экспериментов с микроорганизмами, чистой грибной культурой, грибной споровой массой, лишайниками, семенами и биообъектами. Биообъекты экспонировались в условиях открытого космоса. Перед спуском с орбиты термоизолированная крышка контейнеров НА закрывалась, защищая тем самым биообъекты от перегрева при прохождении спускаемого аппарата через плотные слои атмосферы.

Другой эксперимент с условным названием «Метеорит» был направлен на изучение возможности сохранения жизнеспособности термофильных культур бактерий в условиях аэродинамического нагрева при прохождении их минерального носителя (аналог метеорита) в составе СА через плотные слои атмосферы. Научной аппаратурой для этого эксперимента служил искусственный метеорит, который крепился в теплозащитном покрытии СА.

Заключение

Предварительные результаты показывают важность проведения исследований на животных для понимания влияния условий КП на организм человека. К сожалению, сложность выполнения программ экспериментальных исследований на животных в КП ограничивает частоту их проведения и предполагает использование коллективных усилий и знаний большого научного сообщества. Российские и зарубежные экспериментаторы после успешного выполнения 1-го этапа послеполетных исследований настоятельным образом рекомендуют, не отказываясь от перспектив использования МКС, продолжить эксперименты на животных в полетах автоматических КА. Данные исследования помогут глубже понять механизмы воздействия факторов КП на живые системы, включая человека, расширят возможности решения фундаментальных проблем общей биологии и физиологии.

Результатом реализации проекта «Бион-М1» являются не только новые научные данные. Благодаря этому проекту после 16-летнего перерыва в полетах биоспутников вновь создана инфраструктура, способная решать задачи такой сложности и масштаба. Сформирована научная кооперация, в которую входят российские институты РАН, РАМН и университеты из большинства регионов России, а также ведущие зарубежные университеты и научные учреждения Украины, Казахстана, Германии, Франции, Болгарии, США.

В ГНЦ РФ – ИМБП РАН создана экспериментальная база, в том числе стендовая, для проведения широкомасштабных исследований, разработаны и отработаны методики, позволяющие с использованием современного технологического аппаратурного обеспечения проводить на клеточном и молекулярно-генетическом уровнях углубленные исследования тонких механизмов реакции живых систем на воздействие факторов КП и космического пространства и оценивать биологические последствия этих воздействий для животного организма, включая человека.

Работа по проекту «Бион-М1» выполнена при поддержке Федерального космического агентства и Президиума Российской академии наук.

Авторы выражают благодарность всем участникам работ по проекту «Бион-М1» за самоотверженную работу, энтузиазм и преданность идеям освоения космоса.

Список литературы

1. *Сычев В.Н., Левинских М.А., Гурьева Т.С. и др.* Биологические эксперименты в пилотируемых космических полетах // Космическая медицина и биология: Сб. науч. ст. / А.И. Григорьев, И.Б. Ушаков, ред. М., 2013. С. 170–192.

Sychev V.N., Levinskikh M.A., Gurieva T.S. et al. Biological experiments in piloted space flights // Kosmicheskaya Meditsina i Biologiya: Sbornik nauchnikh statey / A.I. Grigoriev, I.B. Ushakov, eds. Moscow, 2013. P. 170–192.

2. *Газенко О.Г., Ильин Е.А.* Биоспутники: адаптация к невесомости // Наука и человечество. М., 1988. С. 277–291.

Gazenko O.G., Ilyin E.A. Biosatellites: adaptation to weightlessness // Nauka i chelovechestvo. Moscow, 1988. P. 277–291.

3. *Григорьев А.И., Ильин Е.А.* Животные в космосе: к 50-летию космической биологии // Вестн. Рос. акад. наук. 2007. Т. 77. № 1. С. 963–974.

Grigoriev A.I., Ilyin E.A. Animals in space: to 50-years of space biology // Vestnik Rossiyskoy akademii nauk. 2007. V. 77. № 1. P. 963–974.

4. *Ильин Е.А.* Программа «Бион» – от прошлого к будущему // Авиакосм. и экол. мед. 2008. Т. 42. № 6. С. 57–59.

Ilyin E.A. Bion program – from the past to the future // Aviakosmicheskaya i ekologicheskaya meditsina. 2008. V. 42. № 6. P. 57–59.

5. *Nikitin V.B., Proshina A.E., Kharlamova A.S. et al.* Comparative studies of the thick-toed geckos after the 16 and 12 days spaceflights in Foton-M experiments // J. Gravit. Physiol. 2008. V. 15. № 1. C. 285–288.

6. *Balaban P.M., Malyshev A.Y., Ierusalimsky V.N. et al.* Structure and function of the snail Statocyst system after orbital missions of Foton-M2 and Foton-M3 // Ibid. 2008. V. 15. № 1. P. 273–276.

7. *Солдатов П.Э., Смирнов И.А., Ильин Е.А. и др.* Условия содержании и жизнеобеспечения монгольских песчанок в полете космического аппарата «Фотон-М3» // Авиакосм. и экол. мед. 2009. Т. 43. № 5. С. 12–18.

Soldatov P.E., Smirnov I.A., Ilyin E.A. et al. Habitability and life support for Mongolian gerbils in flight of spacecraft Foton-M3 // Aviakosmicheskaya i ekologicheskaya meditsina. 2009. V. 43. № 5. P. 12–18.

Поступила 10.02.2014

THE BION-M1 PROJECT: OVERVIEW AND FIRST RESULTS

Sychev V.N., Ilyin E.A., Yarmanova E.N., Rakov D.V., Ushakov I.B., Kirilin A.N., Orlov O.I., Grigoriev A.I.

Aviakosmicheskaya i Ekologicheskaya Meditsina (Russia). 2014. V. 48. № 1. P. 7–14

Biosatellite BION-M1 was launched on April 19 and landed on May 19, 2013. The mission program was largely a continuation of the earlier flown 11 BION projects, FOTON-M2 and FOTON-M3. The biosatellite was inhabited by a great variety of living organisms used for experiments and studies in gravitational physiology, gravitational biology, biotechnology, astrobiology and radiation biology, dosimetry and spectrometry. This was the first time in the history of national biology and physiology when male mice C57bl/6 were chosen for a long-term space experiment focused upon molecular biology investigations. Unfortunately, because of technical failures during the flight a part of the animals were lost. However, the major objectives were attained through reconsideration of biomaterial division among investigators and completion of virtually the total scope of investigations.

Key words: biosatellite BION-M1, microgravity, mice, gerbils, microorganisms.

УДК 611.12:001.891.5:629:783.525

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ НА МЫШАХ ПО ПРОГРАММЕ ПОЛЕТА БИОСПУТНИКА «БИОН-М1»

Андреев-Андриевский А.А.[1, 2], Шенкман Б.С.[1], Попова А.С.[1, 2], Долгов О.Н.[3], Анохин К.В.[3, 4], Солдатов П.Э.[1], Виноградова О.Л.[1], Ильин Е.А.[1], Сычев В.Н.[1]

[1]Государственный научный центр Российской Федерации – Институт медико-биологических проблем РАН, Москва
[2]Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова
[3]Научно-исследовательский институт нормальной физиологии им. П.К. Анохина, Москва
[4]Центр нано-, био-, информационных и когнитивных наук Курчатовского института, Москва
e-mail: bionomy@imbp.ru

Целью проекта «Бион-М1» являлось создание научных и технологических основ для решения медицинских проблем будущих полетов человека в дальний космос. Научная программа исследований на мышах была сфокусирована на выявлении клеточных и молекулярных механизмов реакции мышц, костей, сенсомоторной, сердечно-сосудистой и иммунной систем на длительное пребывание в условиях микрогравитации. Исследования носили комплексный характер и сочетали прижизненные измерения с исследованиями тканей и клеток мышей современными морфологическими, биохимическими и молекулярно-биологическими методами.

В качестве объекта исследований были выбраны самцы мышей линии C57/bl6 возрастом 4–5 мес. Мышей полетной группы, группы наземного контрольного эксперимента, а также 2 групп животных, содержавшихся в виварии (виварный контроль), обследовали сразу после возвращения и после 7-суточного периода реадаптации.

Некоторые физиологические функции регистрировали на протяжении всего полета.

Для обеспечения благополучия животных в экспериментах, а также для повышения качества научных данных мыши перед полетом проходили специальную подготовку. Подготовка была направлена на адаптацию животных в группах совместного содержания, к полетному корму и стрессирующим условиям космического полета. Подготовка мышей, предназначенных для послеполетных прижизненных исследований, включала предполетное тестирование и обучение до полета.

Ключевые слова: биоспутник, микрогравитация, мыши.

Авиакосмическая и экологическая медицина. 2014. Т. 48. № 1. С. 14–27.

Успех освоения человеком околоземного космического пространства во многом основан на результатах биомедицинских исследований на животных. Целью этих исследований является в первую очередь оценка влияния микрогравитации и других факторов космического полета на организм. Именно в экспериментах на животных было установлено, что организм может выжить во время запуска космического аппарата или непродолжительного пребывания в невесомости [2, 24]. В этих исследованиях были использованы собаки – традиционный объект отечественной физиологии. Многие из этих собак и даже их щенки стали известны всему миру. Проведение исследований с животными приблизило полет в космос первого человека – Ю.А. Гагарина.

По мере роста числа и, что важнее, продолжительности полетов космонавтов стало очевидно, что пребывание в невесомости оказывает выраженное влияние на организм человека. Характер изменений основных физиологических систем и их механизмы были исследованы в рамках программы «Бион». «Бион» – серия из 11 полетов специально сконструированных космических аппаратов – биоспутников (1973–1997), на борту которых были проведены эксперименты с 212 крысами, 12 обезьянами и рядом других биологических объектов. Длительность полетов составляла от 5 до 22,5 сут.

Именно в рамках программы «Бион» получены основные данные о механизмах вестибулярных рефлексов, о состоянии сенсорного аппарата в условиях невесомости, о гипоадренергических сдвигах в структурах головного мозга, о закономерностях атрофических изменений скелетных мышц (наиболее выраженные изменения характерны для постуральных экстензоров). Были установлены новые закономерности управления мышечной активностью – инактивация постуральных и активация флексорных мотонейронов. В рамках программы «Бион» впервые были получены данные об изменении изоформного состава легких и тяжелых цепей миозина в сторону преобладания быстрых изоформ. Впервые в рамках программы установлены основные закономерности процессов резорбции кости.

В экспериментах на борту 4 биоспутников «Бион» была показана эффективность использования искусственной силы тяжести для профилактики изменений, обусловленных пребыванием в невесомости. Важным результатом программы «Бион» стало создание научного фундамента для разработки российской системы профилактики, используемой для предотвращения и коррекции негативного воздействия невесомости на организм космонавтов и сегодня. Задачи освоения дальнего космоса обусловливают необходимость проведения биомедицинских исследований на животных, конечной целью которых должно стать научное обоснование и рекомендации по созданию системы мер профилактики и коррекции негативного воздействия факторов длительного космического полета (КП) и пребывания на других планетах. Известно, что после возвращения на Землю космонавты проходят длительный курс восстановления (реабилитации), однако в случае межпланетного полета ситуация будет принципиально иной, и космонавты, после того как окажутся в гравитационном поле Луны, Марса или астероидов, должны быть сразу вовлечены в активную деятельность.

В настоящее время задача обеспечения быстрого восстановления работоспособности космонавтов после длительного пребывания в космическом пространстве не решена в полном объеме. Для ее решения необходимы данные о тонких механизмах адаптации различных систем организма к условиям невесомости и реадаптации к условиям планетной гравитации. На сбор и анализ этих научных данных и был направлен проект «Бион-1М». Этот проект продолжает отечественную программу биомедицинских исследований на животных в космосе с использованием современных экспериментальных технологий.

Первый полет по программе «Бион-М» состоялся в 2013 г. – через 16 лет после полета последнего биоспутника по программе «Бион». «М» в названии программы – сокращение от слова «модернизированный», что в равной степени справедливо как для научной программы полета, так и для конструкции космического аппарата. Общая характеристика проекта «Бион-М1» представлена в отдельной статье в данном выпуске журнала.

Целью научной программы экспериментов на мышах в проекте «Бион-М1» было исследование клеточных и молекулярных механизмов адаптаций основных физиологических систем к микрогравитации, а также реадаптации к условиям гравитационного поля Земли после возвращения животных. Основные усилия были сфокусированы на исследовании реакции сенсомоторной и нервной систем

в целом, опорно-двигательной, сердечно-сосудистой, иммунной систем на длительное пребывание в условиях микрогравитации. Исследования носили комплексный характер и сочетали прижизненные измерения с исследованиями структурных и функциональных изменений органов и тканей in vitro.

Основным объектом биомедицинских исследований в программе «Бион-М» стали мыши линии C57/BL6, имеющие ряд достоинств в качестве объекта космической биологии. Мыши являются самыми мелкими из лабораторных грызунов, и в этом состоит наиболее очевидное их преимущество, поскольку возможность запуска сразу большого числа животных, обусловленная их малыми размерами, позволяет существенного увеличить объем получаемых научных данных. Мыши, пожалуй, наиболее изученные экспериментальные животные. Так, именно их геном был расшифрован одним из первых. Хорошо разработаны и активно применяются технологии получения генетически модифицированных животных. В частности, генетические модификации мышей позволяют создавать специфические экспериментальные модели, которые дополняют существующие многочисленные и различные по фенотипу линии мышей, а значит, и возможности исследования клеточных и молекулярных механизмов физиологических функций. Немаловажно, что многие методы и оборудование для физиологических исследований на целом организме к настоящему времени адаптированы к использованию на мышах.

Мыши – новый объект для современного этапа отечественных космических исследований. В то же время именно мыши наряду с собаками и обезьянами были одним из ключевых объектов исследований в США. Самые первые эксперименты, проводившиеся в этой стране в середине прошлого века, как и в СССР, были направлены на выяснение возможности выживания млекопитающих в КП [1, 10]. Систематические биомедицинские исследования на мышах проводились в полетах Шаттлов STS-90, STS-108, STS-129, STS-131, STS-133 и STS-135. Научная программа этих экспериментов была направлена на исследования мышц, костей, соединительнотканных структур, нервной, сердечно-сосудистой и иммунной систем. В экспериментах использовали самок мышей, которых экспонировали в условиях микрогравитации 12–16 сут. Ткани животных исследовали вскоре после возвращения на Землю. Следует, однако, отметить, что объем опубликованных результатов по этой программе относительно невелик [7, 8, 20, 30, 34].

Наиболее длительным КП мышей к настоящему времени является эксперимент MDS (Mice Drawer System) итальянского космического агентства. В рамках этого эксперимента 6 мышей содержали на борту Международной космической станции (МКС) в течение 91 сут. Блоки содержания животных нуждались в периодическом обслуживании экипажем. В этом эксперименте были использованы те возможности, которые предоставляют технологии генетической модификации мышей: 3 мыши были трансгенными с гиперэкспрессией плейотропина, другие 3 – дикого типа. К сожалению, цели эксперимента были достигнуты только частично, поскольку половина мышей по различным причинам погибла в ходе полета [12, 28].

Благополучию животных в космических экспериментах с самых первых полетов уделялось пристальное внимание. Собак, обезьян, крыс и песчанок специально готовили к КП [3–5, 33]. Целями подготовки животных было обеспечение как их благополучия во время эксперимента, так и качества научных данных. Для мышей, ставших основным объектом исследований в полете «Бион-М1», также была разработана специальная программа подготовки.

В данной статье изложены описание основных исследований, проведенных на мышах по проекту «Бион-М1», схемы проведенных экспериментов и программа подготовки животных к ним.

Ключевые направления и методы исследований

Основной целью научной программы экспериментов на мышах в проекте «Бион-М1», как уже упомянуто выше, было исследование клеточных и молекулярных механизмов адаптаций организма млекопитающих к микрогравитации.

Исследования нервной системы включали наблюдения за поведением животных в ходе полета, а также в пред- и послеполетный периоды. Анализировали как свободное поведение животных в условиях «домашней клетки», так и поведенческие реакции в стандартизированных экспериментальных условиях. Отдельно необходимо выделить исследования когнитивной функции животных, а именно памяти и способности к обучению. Для этого исследования у мышей в предполетный период был выработан оперантный навык, а после возвращения на Землю были исследованы его воспроизведение и выработка нового, более сложного навыка. Адаптационные изменения сердечно-сосудистой системы в условиях космического полета являются одним из ключевых факторов, определяющих снижение работоспособности после возвращения человека на Землю. В рамках проекта «Бион-М1» была впервые проведена непрерывная регистрация артериального давления (АД) и частоты сокращений сердца (ЧСС) на протяжении всего полета, включая этапы гипергравитации во время запуска и приземления, а также в пред- и послеполетный периоды. Гемодинамические показатели сопоставляли с уровнем физической

активности животных с целью определения ее метаболической стоимости.

Кроме исследований, проведенных in vivo и направленных на анализ влияния факторов КП на поведение животных и некоторые прижизненные вегетативные показатели, значительная часть исследований была ориентирована на оценку влияния факторов КП на метаболизм, структуру и функцию органов и тканей.

Для этого 11 животных полетной группы, как и 12 животных виварного контроля, сразу после прибытия в ГНЦ РФ – ИМБП РАН были подвергнуты эвтаназии методом цервикальной дислокации. Способ эвтаназии был одобрен Комиссией института по биомедицинской этике. Биоматериал этих животных был немедленно забран и подвергнут первичной обработке для тканевого анализа.

Для анализа был получен материал следующих органов и тканей: структур головного мозга, вестибулярного аппарата, сетчатки и хрусталика глаза, спинного мозга, мышц задних конечностей и спины, позвоночника, костей передних и задних конечностей, суставных и хрящевых структур, костно-сухожильного сочленения, костного мозга. Был также получен материал миокарда, мозговых артерий и сосудов задних конечностей, легких, органов пищеварительного тракта, печени, почек, селезенки, тимуса, кожи, слюнных желез и семенников. Были взяты пробы крови. Все тканевые пробы предназначались как для структурного анализа (включая традиционную гистологию, электронную микроскопию, традиционную гистохимию и иммуногистохимию), так и для биохимического и молекулярно-биологического анализа (иммуноферментный анализ, высокоэффективная жидкостная хроматография, вестерн-блот, полимеразная цепная реакция в реальном времени, полногеномный анализ экспрессии генов). Часть материала была подвергнута биосенсорному анализу. Часть проб скелетных мышц, миокарда и гладкомышечные ткани сосудов были подвергнуты механобиологическому анализу in vitro с помощью механомиографа и атомной силовой микроскопии.

Аналогичной диссекции с забором биоматериала через 7 сут после полета были подвергнуты и мыши, прошедшие комплекс тестирующих процедур (см. выше) в ходе периода реадаптации, а также животные, экспонированные в полетной аппаратуре в течение 30 сут на Земле.

Научная программа экспериментов с мышами, представленная здесь в кратком виде, неоднократно обсуждалась на заседаниях ученого совета ГНЦ РФ – ИМБП РАН, Секции по космической биологии и физиологии совета РАН по космосу и утверждена вице-президентом РАН академиком А.Ф. Андреевым 9 ноября 2012 г.

Схема эксперимента

Полетный эксперимент на борту биоспутника «Бион-М1» был проведен в период с 19 апреля по 19 мая 2013 г., полетная группа мышей (П) была экспонирована в условиях микрогравитации в течение 30 сут. Отставленный наземный контрольный эксперимент, в котором были воспроизведены условия содержания и среды обитания на биоспутнике, проходил с 26 июля по 26 августа 2013 г. В ходе этого эксперимента группу животных (К) содержали в блоках «БИОС-МЛЖ», использованных в полетном эксперименте и прошедших после полета техническое обслуживание. Блоки содержания животных были установлены в климатической камере, в которой воспроизводили температуру, влажность и газовый состав атмосферы в полете биоспутника. Для учета возможных сезонных различий в физиологических показателях животных отдельные группы мышей содержали в стандартных условиях вивария одновременно с полетным (ПВ) и наземным контрольным экспериментами (КВ).

Каждая из групп мышей состояла из 45 животных, из них 10 – для прижизненных исследований и оценки динамики восстановления после эксперимента и 35 – для исследований in vitro. После 7-суточного периода наблюдения за реадаптацией после возвращения или окончания контрольного эксперимента мышей подгруппы «восстановление» обследовали по той же программе, что и животных «острой» подгруппы, обследованных сразу после окончания полета и контрольного эксперимента. Каждая подгруппа из 10 животных, предназначенных для прижизненных исследований, включала 5 мышей с вживленными телеметрическими датчиками АД и 5 интактных животных. В дополнение к основным 4 группам животных, к экспериментам готовили мышей, дублирующих основную полетную группу.

Все эксперименты выполнены на самцах мышей линии C57/BL6N, возраст которых на момент запуска биоспутника (или начала контрольного эксперимента) составлял 19–20 нед. Животные были свободны от патогенной микрофлоры. Во всех экспериментах самцов содержали группами по 3 особи («тройка») в клетке.

В этой связи необходимо привести следующие причины выбора линии, пола, возраста и условий содержания животных. Линия мышей C57/BL6 (N в полном названии линии обозначает подлинию Национального института здоровья США) является одной из наиболее широко используемых и была выбрана на основании пожеланий участников проекта. Фенотип этих мышей крайне подробно изучен и в целом не имеет особенностей. Выбор возраста животных был связан с тем, что в 4–5 мес мыши достигают зрелости, скорость их роста замедляется,

а ожирение, к которому склонны мыши C57/BL6, как правило, развивается гораздо позднее.

Выбор животных мужского пола был обусловлен несколькими преимуществами самцов по сравнению с самками в качестве объекта исследований для реализации научной программы «Бион-М1». Наиболее важным плюсом является относительно стабильный уровень половых стероидов у мужских особей. Хорошо известно, что циклические изменения уровня женских половых гормонов оказывают выраженное влияние практически на все без исключения физиологические функции. Во-вторых, самцы мышей значительно (на 20–30 %) крупнее самок. Наконец, использование самцов позволило провести исследование половой функции мужского организма после длительного КП. Таким образом, именно использование самцов отвечало требованиям научной программы проекта, а также позволило снизить вариабельность экспериментальных данных, обусловленную факторами, не связанными напрямую с воздействием микрогравитации. В то же время хорошо известна высокая агрессивность зрелых самцов мышей этой линии. Возможность избыточной внутригрупповой агрессии рассматривалась как один из серьезных факторов риска для благополучия животных, а меры для минимизации этих рисков были предприняты на этапе подготовки животных к полету.

Влияние микробиологического статуса на состояние иммунной системы организма очевидно и не требует разъяснений. Существуют данные, свидетельствующие о повышении вирулентности микроорганизмов в условиях КП [6, 37]. Поэтому для обеспечения здоровья мышей в ходе полета представлялось целесообразным использовать животных, свободных от патогенной микрофлоры. Дополнительной выгодой от использования животных с контролируемой микрофлорой является снижение вариабельности экспериментальных данных [22].

Представленная в данной статье обширная программа научных исследований на мышах должна была быть выполнена на относительно небольшом числе животных. В этой связи с целью снижения вклада индивидуальной изменчивости в общую вариабельность экспериментальных данных физиологические эксперименты по возможности строили таким образом, чтобы проводить измерения у одних и тех же животных повторно [17]. Особенно важно данное соображение для исследований поведения и других прижизненных измерений, поэтому животные, предназначенные для прижизненных исследований, были протестированы и обучены до полета, а по результатам предполетных исследований были отобраны гомогенные группы.

Эвтаназия животных проводилась методом цервикальной дислокации, выбранным как наименее противоречащим реализации задач научной программы.

Подготовка животных к эксперименту

Программа подготовки мышей к экспериментам включала в себя меры, направленные на минимизацию рисков для благополучия животных, определенных при составлении схемы экспериментов, а также на обеспечение качества экспериментальных данных. Стоит отметить, что длительность подготовки животных к эксперименту превышала длительность собственно эксперимента.

Подготовка животных состояла в индивидуальной маркировке мышей, формировании групп совместного содержания из 3 животных и отборе устойчивых «троек», адаптации мышей к полетному корму и стрессирующим условиям эксперимента. Подготовка животных, предназначенных для прижизненных исследований, была более обширна и включала вживление датчиков АД и проведение предполетного тестирования поведения и функционального состояния животных, результаты которого были использованы для формирования гомогенных экспериментальных групп.

Основные этапы работы с животными представлены в табл. 1 и 2.

Биоэтика

Биоэтическая экспертиза протокола исследования проводилась Комиссией по биоэтике НИИ митоинженерии МГУ (протокол № 35 от 1 ноября 2012 г.) и Комиссией по биомедицинской этике ГНЦ РФ – ИМБП РАН (протокол № 319 от 4 апреля 2013 г.). Эксперименты выполнялись в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 18 марта 1986 г.) [15] и приказом № 742 Министерства высшего и среднего специального образования СССР «Об утверждении Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» от 13.11.1984.

Животные

Самцы мышей C57/BL6N числом 300 особей были получены из филиала Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова – питомника лабораторных животных «Пущино» в возрасте 8–9 нед. Адаптация животных после получения из питомника составила 2–3 сут.

Все животные были СПФ-статуса. При работе с животными соблюдались меры, предотвращающие их контаминацию.

Таблица 1

Ключевые даты полетного эксперимента

Мероприятия	Время относительно запуска (L) или возвращения (R)
Получение мышей из питомника	L – 51 сут
Маркировка животных	L – 50 сут
Вживление датчиков артериального давления	L – 50 сут
Взвешивание и осмотр, ежедневно	L – 50 сут – L –3 сут
Коадаптация мышей в группах совместного содержания	L – 45 сут – L –3 сут
Адаптация мышей к пастообразному корму	L – 14 сут – L – 3 сут
Предполетное обучение и тестирование мышей для прижизненных исследований	L – 30 сут – L – 9 сут
Транспортировка на Байконур	L – 7 сут
Адаптация на космодроме	L –7 сут – L – 3 сут
Окончательный отбор животных полетной группы	L – 3 сут
Размещение животных в аппаратуре «БИОС-МЛЖ»	L – 3 сут
Установка «БИОС-МЛЖ» на космический аппарат	L – 3 сут
Наблюдение за мышами	L – 3 сут – L – 1 сут
Транспортировка биоспутника для дальнейшей сборки	L – 2 сут
Транспортировка ракеты на пусковой стол	L – 1 сут
Установка на пусковом столе	L – 16 ч
Запуск (14.00 19.04.2013)	L – 0
Полет биоспутника «Бион-М1»: 477 витков – 30 дней (19.04.–19.05.2013)	
Включение тормозных двигателей	R – 0,75 ч
Вход в атмосферу	R – 0,25 ч
Открытие парашюта	R – 0,17 ч
Включение двигателей мягкой посадки (07.11 19.05.2013)	R – 0
Прибытие поисково-спасательной бригады	R + 0,25 ч
Демонтаж аппаратуры «БИОС-МЛЖ»	R + 2 ч –R + 3 ч
Обследование мышей на месте приземления	R +2 ч – R + 5 ч
Транспортировка в Москву	R + 5 ч – R + 12 ч
Эвтаназия и исследования *in vitro*	R + 13 ч – R + 25 ч
Реадаптация животных и прижизненные исследования	R + 0 сут – R + 7 сут
Эвтаназия группы «Восстановление» и исследования *in vitro*	R + 7 сут

Таблица 2

Ключевые даты контрольного эксперимента

Мероприятия	Время относительно начала (S) или конца эксперимента (E)
Получение мышей из питомника	S – 38 сут
Маркировка животных	S – 37 сут
Вживление датчиков артериального давления	S – 36 сут
Взвешивание и осмотр, ежедневно	S – 37 сут – S – 2 сут
Коадаптация мышей в группах совместного содержания	S – 29 сут – S – 2 сут
Адаптация мышей к пастообразному корму	S – 14 сут – S –2 сут
Предполетное обучение и тестирование мышей для прижизненных исследований	S – 21 сут – S – 6 сут
Транспортировка в ИМБП	S – 1 сут
Размещение животных в аппаратуре «БИОС-МЛЖ»	S – 1 сут
Установка аппаратуры «БИОС-МЛЖ в климатическую камеру»	S – 1 сут
Наблюдение за мышами	S – 1 сут – S – 0
Начало наземного контрольного эксперимента (14.00 26.07.2013)	S0
Наземный контрольный эксперимент – 30 сут (26.07–26.08.2013)	
Конец наземного контрольного эксперимента (09.00 26.08.2013)	E – 0
Демонтаж аппаратуры «БИОС-МЛЖ»	E + 1ч – E + 2 ч
Осмотр мышей	E + 1 ч – E + 3 ч
Имитация транспортировки	E + 4 ч – E + 8 ч
Эвтаназия и исследования in vitro	E + 8 ч – E + 23 ч
Реадаптация животных и прижизненные исследования	E + 0 сут – E + 7 сут
Эвтаназия группы «Восстановление» и исследования in vitro	E + 7 сут

Таблица 3

Параметры среды содержания животных на борту биоспутника, в климатической камере во время наземного контрольного эксперимента и в виварии

Показатель (M ± SD)	Виварий	Биоспутник	Контрольный эксперимент
Температура, °C	23 ± 1,5	21,1 ± 0,4	21,3 ± 0,8
Относительная влажность, %	49 ± 17	61 ± 3	71 ± 2
Давление, мм рт. ст.	–	762 ± 6	747 ± 3
O_2, %	–	21,2 ± 1,1	21,2 ± 0,5
CO_2, %	–	0,002 ± 0,005	0,0682 ± 0,0718

Параметры микроклимата

Животных содержали при температуре 20–27 °C, относительной влажности 20–75 %, 12-часовом световом дне (включение света в 09.00). Параметры микроклимата на биоспутнике, в климатической камере при проведении наземного контрольного эксперимента и в виварии практически не различались (табл. 3) и соответствовали требованиям, предъявляемым к условиям содержания мышей [16, 21]. Параметры среды обитания на биоспутнике соответствовали техническому заданию на протяжении всего полета.

Первичные ограждения

До полета (за исключением непродолжительного периода предполетного тестирования) мышей содержали в индивидуально вентилируемых клетках (GM500, Techniplast) с площадью пола 500 см². Среду обитания обогащали укрытиями (Techniplast), представляющими собой треугольные камеры из красного акрила с 2 входами, картонными цилиндрами, а в качестве гнездового материала мышам предоставляли бумажные салфетки. Все поступающие к животным материалы были стерильными. Смену клеток осуществляли 1 раз в неделю.

Во время полетного и наземного контрольного экспериментов мышей содержали в блоках «БИОС-МЛЖ» (рис. 1), устройство которых описано в статье Сычева В.Н., Ильина Е.А., Ярмановой Е.Н. и др. «Проект «Бион-М1»: общая характеристика и предварительные итоги» в данном выпуске журнала.

Идентификация животных

Животные были индивидуально маркированы с использованием 2 систем меток: надрезами ушных раковин и чипами радиочастотной идентификации (RFID). Для чипирования животных использовали RFID-чипы размером 1,4 x 8,5 мм (EI1000 Felixcan, Испания), которые вживляли подкожно в области холки под местной анестезией.

Групповое содержание

Мышей содержали группами по 3 особи, что считается оптимальным для содержания самцов мышей [36]. Формирование и отбор устойчивых групп совместного содержания было ключевым элементом предполетной подготовки, направленной на предотвращение избыточной агрессии во время полетного и наземного контрольного экспериментов, когда доступ к животным был невозможен.

Сразу после получения из питомника мыши были рассажены группами по 3 особи, после чего наблюдали за их состоянием и групповым поведением. Наблюдения за мышами состояли в их ежедневном осмотре и взвешивании. Наличие у мышей покусов (как правило, расположенных на хвосте, коже спины или задних лап) и/или резкое (более, чем на 1 г) снижение массы тела считали признаками избыточной агрессии в группе совместного содержания.

Хорошо известно, что даже простейшие манипуляции вызывают у мышей острую стресс-реакцию, причем если адаптация поведения мышей к экспериментальным манипуляциям происходит относительно быстро, то вегетативные реакции (повышение АД, ЧСС, температуры и уровня

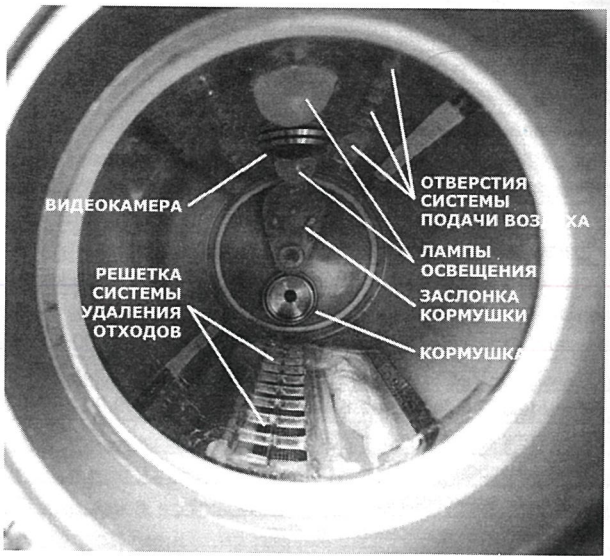


Рис. 1. Интерьер блока содержания животных

кортикостерона в крови) с ростом числа повторений манипуляционных процедур затухают медленно [9, 14, 18, 35]. Таким образом, ежедневные манипуляции с животными, помимо оценки их состояния, позволяли адаптировать мышей к стрессирующим условиям эксперимента [23], а кроме того, служили своеобразной «провокацией», выявляющей животных с избыточной агрессивностью. После ежедневных манипуляций наблюдали за поведением мышей в группе с целью регистрации избыточных агрессивных взаимодействий, свидетельствующих о неустойчивости данной группы совместного содержания.

Смена клеток также является фактором, провоцирующим агрессивные взаимодействия в группах самцов мышей с неустойчивой иерархией, поскольку разрушает систему запаховых меток [36]. Поэтому после смены клеток наблюдали за поведением мышей с целью выявления неустойчивых групп. Наконец, об устойчивости иерархии в группе судили по наличию общего гнезда и использованию укрытия. Укрытия являются ценным для мышей ресурсом, а самцы при групповом содержании конкурируют за их использование [36]. По нашим наблюдениям, хорошим индикатором устойчивости иерархии в группе мышей является наличие общего группового гнезда, размещенного, как правило, внутри укрытия. Таким образом, о взаимоотношениях в группе мышей судили по наличию видимых покусов, наличию общего гнезда и поведению животных после ежедневных манипуляций и чистки клеток. Группы, в которых наблюдали избыточные агрессивные взаимодействия, либо переформировывали (с использованием резервных животных), либо исключали из экспериментов.

Всего из 300 животных удалось сформировать 88 «троек» (88 % мышей ужились в группах), из них 53 группы для полетного эксперимента (П) и синхронного ему содержания мышей в виварии (ПВ) и 35 групп – для отставленного наземного контрольного эксперимента (К) и виварной контрольной группы (КВ). Состав 12 из 88 сформированных «троек» (14 %) изменяли в период коадаптации.

Кормление животных

На 1-м этапе подготовки мыши получали стандартный гранулированный комбикорм («Чара для содержания», Ассортимент-Агро, Россия) и деионизированную воду. Затем животных полетной группы (П) и группы наземного контрольного эксперимента (К) переводили на питание «полетным» пастообразным кормом. Животные виварных групп (ПВ и КВ) получали стандартный комбикорм и воду на протяжении всего эксперимента. Животные имели свободный доступ к корму и воде (или пастообразному корму), за исключением периода предполетного тестирования, когда в целях стимуляции выработки оперантного навыка норму выдачи корма корректировали таким образом, чтобы масса тела мышей снижалась до 80–90 % от исходной [26].

Полетный корм был разработан в Т.С. Гурьевой и Е.И. Медниковой в ГНЦ РФ – ИМБП РАН с учетом потребностей животных и технических характеристик системы подачи корма в аппаратуре БИОС-МЛЖ и представлял собой пасту из стандартного комбикорма, воды и казеина в качестве загустителя. Содержание воды в пастообразном корме составляло 76–78 %. Адаптацию мышей к питанию пастообразным кормом проводили постепенно. В первые 1–2 дня мыши имели доступ к стандартному комбикорму, воде и пастообразному корму, затем убирали поилку, а спустя еще 2–3 дня исключали и гранулированный комбикорм.

Среднее потребление гранулированного корма мышами виварных групп (ПВ и КВ) составляло $1{,}3 \pm 0{,}14$ г/10 г массы тела, воды – $1{,}52 \pm 0{,}65$ мл/10 г массы тела, потребление пастообразного корма мышами полетной и контрольной групп (П и К) составляло 5,52 ± 0,88 г/10 г массы тела (среднее ± стандартное отклонение). С учетом влажности пастообразного корма (76–78 %) потребление сухого вещества составляло 1,27 ± 0,2 г/10 г массы тела, что не отличается от потребления стандартного комбикорма ($t = 0{,}52$, $p = 0{,}6097$, тест Стьюдента). В то же время количество воды, которое мыши потребляли при питании пастообразным кормом, составляло 4,25 ± 0,67 г/10 г массы тела, что примерно втрое превышает потребление воды на стандартной диете ($t = 11{,}9$, $p < 0{,}0001$, тест Стьюдента). Таким образом очевидно, что потребление мышами пастообразного корма определялось потребностью в питательных веществах, а не жаждой.

Увеличение потребления воды при питании пастообразным кормом не оказывало видимого негативного воздействия на состояние животных, однако диурез животных был повышен, а моча была менее концентрированной, чем в норме. С целью количественной оценки диуреза при питании стандартным и пастообразным кормом на отдельной группе мышей был проведен эксперимент в метаболических камерах. Четыре группы мышей из 3 особей каждая содержали в метаболических камерах (Techniplast, Италия) и в течение 3 сут выдавали им стандартный комбикорм и воду, а в течение последующих 3 сут – пастообразный корм. При смене диеты на пастообразный корм потребление жидкости снизилось более чем в 5 раз, а диурез возрос почти в 10 раз (табл. 4).

Таблица 4

Масса тела мышей, потребление корма, воды, диурез и дефекации мышей при питании стандартным и полетным пастообразным кормом

Показатель	Стандартный комбикорм + вода	Полетный пастообразный корм
Масса тела, г	25,7 ± 0,62	27,1 ± 0,74*
Потребление корма (г/10 г массы тела)	1,32 ± 0,19	5,96 ± 0,72
Потребление воды (мл/10 г массы тела)	1,2 ± 0,22	4,59 ± 0,55*
Суточный диурез (мл/10 г массы тела)	0,23 ± 0,11	2,44 ± 0,39*
Масса кала в сутки (г/10 г массы тела)	0,23 ± 0,05	0,63 ± 0,1*

* – $p < 0,05$

Вживление датчиков артериального давления

Артериальное давление регистрировали у части животных, предназначенных для прижизненных исследований, с использованием вживляемых датчиков и системы телеметрии (Data Science International, США), адаптированной к использованию на борту биоспутника «Бион-М1» инженерами СКТБ «Биофизприбор» и CNES (Франция). Миниатюрные датчики (PA-C10) массой 1,4 г вживляли не менее чем за 3 недели до использования животных в экспериментах [25]. Мышей наркотизировали сочетанным внутрибрюшинным введением тилетамина, золазепама (по 15 мг/кг каждого) и ксилазина (3 мг/кг) и при необходимости вводили поддерживающие дозы (20–30 % от исходной). Катетер датчика вводили в дугу аорты через правую сонную артерию, а корпус располагали подкожно на боку грудной клетки, согласно инструкции производителя.

В послеоперационный период животных содержали изолированно и давали с питьевой водой ибупрофен (4 мг/мл) для обезболивания и антимикробный препарат широкого спектра действия бактрим (4 мг/мл). Ветеринарный контроль за животными в острый послеоперационный период был ежедневным. О восстановлении животных судили по нормализации массы тела и поведению животных в клетке. Как правило, животные восстанавливались к 5–6-м суткам после операции, после чего их ссаживали с «соседями» из группы совместного содержания.

Были опробованы 2 способа объединения групп после временной изоляции одной из особей. При 1-м способе к оперированной мыши подсаживали 2 ее интактных «соседей», создавая, таким образом, ситуацию «хозяин – чужак» и предоставляя преимущество оперированной мыши. Однако при таком способе воссоединения групп оперированное животное, как правило, реагировало на 2 других особей с избыточной агрессией. Второй способ состоял в ссаживании всех 3 мышей в чистой новой клетке, не предоставляющей преимущества какому-либо из животных. При таком способе воссоединение групп проходило успешно, поэтому его использовали в дальнейшем при воссоединении «троек».

При планировании экспериментов возможность ухудшения состояния животных после вживления датчиков рассматривалась в качестве серьезного фактора риска, поэтому было проведено сравнение поведенческих и функциональных показателей, зарегистрированных в ходе предполетного тестирования, у оперированных (всего датчики были вживлены 35 животным) и интактных мышей. Оперированные животные не отличались от интактных по данным внешнего осмотра, поведенческим показателям в тесте «открытое поле», максимальной произвольной силе, времени удержания на вращающемся стержне, способности к обучению, спонтанной двигательной активности в «домашней клетке» и беговом колесе.

Предполетное тестирование мышей для прижизненных исследований

Мыши, предназначенные для прижизненных исследований, проходили предполетное тестирование и обучение, результаты которого были использованы для отбора гомогенных экспериментальных групп и в качестве фоновых данных для проведения сравнений с послеполетными показателями.

Батарея тестов включала осмотр с элементами неврологического тестирования [32], тест «открытое поле» [13, 19], тест на вращающемся стержне [31], измерение максимальной произвольной силы передних и задних конечностей [29] в 1-е сутки, после чего животных помещали на 7 сут в систему автоматизированного сбора поведенческих данных (Phenomaster, TSE, Германия). С использованием этой системы в течение 7 сут вели непрерывную регистрацию потребления корма и воды, двигательной активности в «домашней клетке», спонтанной двигательной активности в беговом колесе, а также проводили выработку оперантного навыка предпочтения стороны при положительном пищевом подкреплении и свободном доступе животных к обучающему модулю [11, 27]. На протяжении всего

предполетного тестирования у мышей со вживленными датчиками регистрировали АД и ЧСС.

Качество сигнала АД, объем бега в колесе и успешность выработки навыка использовали в качестве критериев включения мышей в экспериментальные группы. Для полетного эксперимента и соответствующей виварной группы (П и ПВ) было протестировано 42 мыши, для наземного контрольного эксперимента и виварной группы (К и КВ) – 30 мышей, из них 26 (62 %) и 16 (53 %) особей соответственно были отобраны для использования в экспериментах (табл. 5).

Транспортировка на Байконур

Животных полетной и дублирующей полетной групп транспортировали на Байконур за 7 сут до запуска. Для транспортировки использовали стандартные транспортировочные контейнеры из непрозрачного синего пластика, снабженные воздушными фильтрами (производства питомника «Пущино», Россия). Транспортировку проводили в несколько этапов авто- и авиатранспортом, ее общая продолжительность составила около 24 ч. Во время транспортировки животные имели доступ к пастообразному полетному корму.

Транспортировка не оказала негативного влияния на состояние мышей, о чем свидетельствует несущественное (на 3 %, 0,9 г) снижение массы тела. Животные полностью восстановились на 2-е сутки после перевозки.

Состояние животных после полетного и наземного контрольного экспериментов

В полетном эксперименте выжило 16 из 45 животных (36 %), в наземном контрольном эксперименте – 38 из 45 мышей (84 %). В связи с гибелью части мышей количество животных в виварных контрольных группах было уменьшено (табл. 6).

Причины гибели мышей были так или иначе связаны с системой подачи корма. Так, серьезная неисправность системы подачи корма в одном из блоков «БИОС-МЛЖ» была причиной гибели всех 15 мышей, содержавшихся в нем. В то же время, в полете существенно изменилось поведение животных: в частности, до полета и в наземном контрольном эксперименте мыши в клетках блоков «БИОС-МЛЖ» предпочитали находиться на решетке системы удаления отходов, а в полете они проводили большую часть времени вблизи кормушек или на них. Причины таких изменений в предпочтении места неясны. Интересно, что такие же изменения поведения мышей были отмечены в эксперименте MDS [12].

Таблица 5

Выполнение мышами критериев для включения в экспериментальные группы в ходе предполетного тестирования

Критерий	Полетная группа и соответствующая группа виварного контроля (П + ПВ)			Группа контрольного эксперимента и группа виварного контроля (К + КВ)		
	да, n	нет, n	да, %	да, n	нет, n	да, %
Удовлетворительное качество сигнала АД	15	5	75	12	3	80
Произвольный бег в колесе более 3 км/сут	34	8	81	25	5	83
Более 95 % правильных реакций при выработке оперантного навыка к 3-м суткам обучения	39	3	93	28	2	93
Стабильность группы совместного содержания (клеток)	19	2	90	14	1	93

Таблица 6

Количество животных в экспериментальных группах

Группа	Исследования in vitro	Исследования in vivo
Полет (П)	11	5
Виварный контроль, синхронный полету (ПВ)	18	20
Наземный контрольный эксперимент (К)	16	9
Виварный контроль, синхронный наземному контрольному эксперименту (КВ)	16	13

По-видимому, в полете части тела мышей попадали в движущиеся части кормушки во время процедуры их наполнения, что и привело к гибели некоторых особей. В пользу этого предположения свидетельствуют данные внешнего осмотра животных после полета. У 4 (25 %) мышей были обнаружены травмы конечностей, у 6 (38 %) – травмы хвоста. Важно отметить, что при испытаниях блока «БИОС-МЛЖ» травм и гибели животных не было. Это позволяет предполагать, что причины гибели животных связаны в первую очередь с изменениями их поведения в условиях микрогравитации.

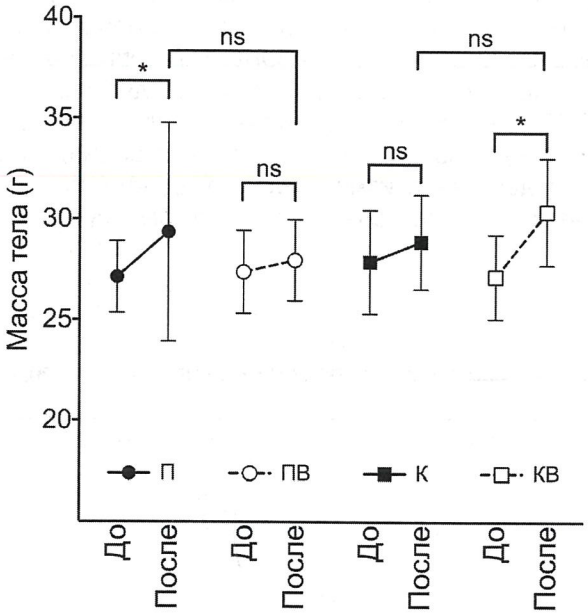


Рис. 2. Масса тела мышей до и после проведения экспериментов. Данные представлены в виде среднее ± стандартное отклонение.
* – $p < 0,05$, ns – отсутствие значимых отличий

При осмотре мышей на месте приземления (через 2–3 ч после возвращения) были обнаружены выраженные признаки дезадаптации моторной функции животных к условиям земной гравитации. Так, мыши не могли поддерживать нормальную позу (14 из 16, 88 %), двигательная активность отсутствовала практически полностью, при тестировании в пробе с падением мыши не переворачивались (6 из 6, 100 %). Восстановление двигательной активности происходило относительно быстро, и через 6–8 ч мыши передвигались по клетке и могли вставать на задние лапы. У всех мышей был отмечен экзофтальм. У 14 из 16 животных было отмечено избыточное выделение мочи.

Упитанность животных после полета существенно варьировала. Масса тела большинства (12 из 16, 75 %) мышей была такой же или несколько выше, чем до полета, масса 3 мышей была на 30–40 % выше, а 1 животное было сильно истощено (масса тела на 50 % ниже, чем до полета). Однако в целом масса тела мышей экспериментальных групп значимо не различалась ($F(3,208) = 2,07$, $p = 0,1043$), более того, только 3 % общей вариабельности было обусловлено различиями между группами (рис. 2). Попарные сравнения массы тела животных разных групп до полета не выявили различий, за исключением того, что масса мышей группы ПВ была на 2,4 г меньше, чем мышей группы КВ ($p = 0,0012$, тест Сидака). При сравнении величин до и после экспериментов обнаружено, что масса тела увеличилась у мышей полетной группы (на 8 %, различия на грани значимости ($p = 0,062$) и высокозначимы ($p = 0,0026$) при исключении из анализа значений для истощенной мыши), а также у мышей виварной группы, синхронной наземному контрольному эксперименту (на 11 %, $p < 0,0001$). В целом, фактор «время» оказывал существенное влияние на массу тела мышей ($F(1,208) = 22,57$, $p < 0,0001$). Таким образом, изменения массы тела основных экспериментальных групп в сравнении с группами виварного контроля в полетном и наземном экспериментах были противоположными. В полете мыши набрали больше веса, чем мыши группы ПВ, а в наземном контрольном эксперименте меньше, чем соответствующий виварный контроль (КВ). По-видимому, такие различия связаны с отсутствием физических нагрузок у мышей в условиях микрогравитации, а также относительно большим, чем в наземном контрольном эксперименте количестве корма на 1 мышь (в связи с гибелью части животных).

Заключение

Проект «Бион-М1» направлен на создание научной основы для разработки новых средств профилактики и коррекции негативного воздействия микрогравитации и других факторов КП на космонавтов. Актуальность этой задачи обусловлена планами организации экспедиций к другим планетам Солнечной системы и соответственно необходимостью обеспечения работоспособности космонавтов как во время длительного КП, так и при нахождении на других небесных телах. Для решения этой научной задачи программа биомедицинских исследований в проекте «Бион-М1» была сфокусирована на исследовании клеточных и молекулярных механизмов адаптации мышц, костей, сенсомоторной, сердечно-сосудистой и иммунной систем в ходе длительного КП и послеполетной реадаптации к воздействию гравитации.

Схема экспериментов для реализации обширной научной программы имела своей целью обеспечить получение качественных научных данных. Объектами исследований были выбраны самцы мышей линии C57/BL6 возрастом 4–5 мес. Животных, находившихся в 30-суточном полете на биоспутнике, обследовали сразу после возвращения и после 7-суточного периода реадаптации к земной гравитации. Для учета факторов, не связанных непосредственно с КП (условий среды обитания, сезонных факторов и т.д.), результаты анализировали в сопоставлении с показателями животных в наземном контрольном эксперименте, в котором были воспроизведены факторы среды обитания на биоспутнике, а также с данными полученными на животных, которых содержали в стандартных условиях вивария.

Важно отметить, что некоторые физиологические показатели мышей регистрировали на протяжении всего полета. Переход к сбору данных у мелких лабораторных грызунов на протяжении всего полета стал технически возможен в результате миниатюризации оборудования для научных исследований и адаптации его к использованию на мышах. Непрерывный сбор данных на протяжении всего полета, осуществленный впервые в полете биоспутника «Бион-М1», значительно повышает научную результативность полетных экспериментов с использованием мелких лабораторных животных.

Несмотря на преимущества использования мышей мужского пола в космических исследованиях (как с научной, так и с технической точки зрения), такой выбор объекта исследований несет в себе также и дополнительные риски, связанные с высокой агрессивностью зрелых самцов. Сложные условия КП, в том числе невозможность реализации нормального поведения в условиях микрогравитации, хирургические манипуляции с мышами до полета, питание пастообразным кормом, также являлись рисками для благополучия животных в эксперименте.

Минимизации рисков для благополучия животных и обеспечение получения качественных научных данных были основными целями программы подготовки мышей к экспериментам. Подготовка включала поддержание микробиологического статуса мышей (свободных от патогенной микрофлоры), коадаптацию в группах совместного содержания и отбор стабильных групп, адаптацию к стрессирующим воздействиям и питанию полетным кормом. Подготовка животных для прижизненных исследований включала также предполетное тестирование и обучение, по результатам которого были отобраны гомогенные по поведенческим и функциональным показателям животные.

К сожалению, неожиданные изменения поведения животных в условиях микрогравитации, технические неполадки и, по-видимому, неудачная конструкция кормушки стали причиной гибели значительной части животных. Очевидно, что при разработке блоков содержания мышей в будущем, следует исключить наличие подвижных элементов внутри камеры для животных.

Состояние животных после полета было в целом хорошим и, по мнению участников проекта, отвечало требованиям к животным, используемым в биомедицинских исследованиях. Таким образом, программу подготовки животных к полету следует признать в целом успешной.

Успех 1-го этапа реализации проекта очевиден. Впервые самцы мышей при групповом содержании были экспонированы в условиях микрогравитации в течение 30 сут на автоматическом космическом аппарате, был собран качественный биологический материал и уже получены первые данные исследований. Мы искренне надеемся, что анализ полученных данных позволит в полном объеме реализовать научные задачи проекта «Бион-М1».

Авторы выражают благодарность коллективу ООО «НИИ митоинженерии МГУ» и лично В.П. Скулачеву, М.В. Скулачеву и И.В. Скулачеву за помощь в организации подготовки мышей к экспериментам и выражают надежду на дальнейшее плодотворное сотрудничество. Мы благодарим Г. Гоклен-Кох, П. Обри, Ж. Лоре и М. Кусто (Национальный центр космических исследований Франции), А.О. Белгородского и его коллег (СКТБ «Биофизприбор») и А.И. Пахомова (ГНЦ РФ – ИМБП РАН), участвовавших в реализации гемодинамических измерений. Авторы благодарны сотрудникам ГНЦ РФ – ИМБП РАН Е.Н. Ярмановой и В.С. Седлецкому за неоценимый вклад и поддержку в критические моменты реализации проекта. Авторы признательны сотрудникам Курчатовского НБИКС-центра за участие в проекте. Мы благодарны Дж. Альбертсу (США) за плодотворное обсуждение программы прижизненных исследований с мышами. Авторы признательны Е.А. Лагеревой и Н.А. Бузину за заботливое отношение к мышам и рекордную скорость подготовки системы Phenomaster к проведению измерений.

Особая благодарность специалистам ГНП РКЦ «ЦСКБ-Прогресс» за создание ракетно-космического комплекса «Бион-М» и безукоризненную работу техники на всех этапах ее эксплуатации.

Список литературы

1. *Антипов В.В., Баевский Р.М., Газенко О.Г. и др.* Некоторые итоги медико-биологических исследований на втором и третьем космических кораблях-спутниках // Проблемы космической биологии. М., 1962. Т. 1. С. 267–298.

Antipov V.V., Baevskiy R.M., Gazenko O.G. et al. Selected results of biomedical research on the second and third space satellites// Problems of space biology. 1962. Moscow, V. 1. P. 267–298.

2. *Григорьев А.И., Ильин Е.А.* Животные в космосе // Вестн. Рос. академии наук. М., 2007. Т. 77. № 11. С. 963–973.

Grigoriev A.I., Iliyn E.A. Animals in space // Vestnik Rossiiskoiy akademii nauk. 2007. V. 77. № 11. P. 963–973.

3. *Газенко О.Г., Георгиевский В.С.* Подготовка животных к эксперименту // Проблемы космической биологии. М., 1962. Т. 1. С. 321–327.

Gazenko O.G., Georgievskiy V.S. Preparation of animals for the experiments // Problems of space biology. 1962. Moscow, V. 1. P. 321–327.

4. *Серова Л.В., Ильин Е.А., Носкин А.Д. и др.* Условия проведения эксперимента, отбор и подготовка животных // Влияние динамических факторов космического полета на организм животных. М., 1979. С. 7–12.

Serova L.V., Iliyn E.A., Noskin A.D. et al. Experimental requirements, selection and preparation of animals // Influence of dynamic spaceflight conditions on the organism of animals. 1979. Moscow, P. 7–12.

5. *Яздовский В.И.* На тропах Вселенной. Вклад космической биологии и медицины в освоение космического пространства. М., 1996.

Yazdovskiy V.I. On the crossroads of the Universe. Contribution of space biology and medicine to space exploration. Moscow, 1996.

6. *Aviles H., Belay T., Fountain K. et al.* Increased susceptibility to Pseudomonas aeruginosa infection under hindlimb-unloading conditions // J. Appl. Physiol. 2003. V. 95. № 1. P. 73–80.

7. *Baqai F.P., Gridley D.S., Slater J.M. et al.* Effects of spaceflight on innate immune function and antioxidant gene expression // Ibid. 2009. V. 106. № 6. P. 1935–1942.

8. *Behnke B.J., Stabley J.N., McCullough D.J. et al.* Effects of spaceflight and ground recovery on mesenteric artery and vein constrictor properties in mice // FASEB J. 2013. V. 27. № 1. P. 399–409.

9. *Bouwknecht J.A., Hijzen T.H., van der Gugten J. et al.* Stress-induced hyperthermia in mice: effects of flesinoxan on heart rate and body temperature // Eur. J. Pharmacol. 2000. V. 400. № 1. P. 59–66.

10. *Burgess C., Dubbs C.* Animals in Space. From Research Rockets to the Space Shuttle. Springer, 2007.

11. *Bushnell P.J.* Advanced behavioral testing in rodents: assessment of cognitive function in animals // Curr. Protoc. Toxicol. 2001. V. 11. Unit 11.4.

12. *Cancedda R., Liu Y., Ruggiu A. et al.* The Mice Drawer System (MDS) Experiment and the Space Endurance Record-Breaking Mice // PLoS ONE. 2012. V. 7. № 5. P. e32243.

13. *Carola V., D'Olimpio F., Brunamonti E. et al.* Evaluation o the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment o anxiety-related behavior in inbred mice // Behav. Brain Research 2002. V. 134. № 1. P. 49–57.

14. *Drude S., Geißler A., Olfe J. et al.* Side effects of contro treatment can conceal experimental data when studying stres responses to injection and psychological stress in mice // Lab Animal. 2011. V. 40. № 4. P. 119–128.

15. European Convention for the Protection of Vertebrat Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes Strasbourg, 18.III.1986.

16. FELASA. Euroguide On the Accommodation and Car of Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes Royal Society of Medicine Press Ltd, 2007.

17. *Festing M.F.* The design of animal experiments. The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory and Other Research Animals. Wiley-Blackwell, 2010. P. 23–36.

18. *Gariépy J.-L., Rodriguiz R.M., Jones B.C.* Handling genetic and housing effects on the mouse stress system dopamine function, and behavior // Pharmacol. Biochem. Behav 2002. V. 73. №. 1. P. 7–17.

19. *Gould T.D., Dao D.T., Kovacsics C.E.* The Open Field Test // Neuromethods. 2009. V. 42. № 1. P. 1–20.

20. *Gridley D.S., Mao X.W., Stodieck L.S. et al.* Changes in Mouse Thymus and Spleen after Return from the STS-135 Mission in Space // PLoS ONE. 2013. V. 8. № 9. P. e75097.

21. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals National Academies Press, 2010.

22. *Howard B.R.* Control of variability // ILAR J. 2002. V. 43 № 4. P. 194–201.

23. *Hurst J.L., West R.S.* Taming anxiety in laboratory mice // Nat. Meth. 2010. V. 7. № 10. P. 825–826.

24. *Ilyin E.A.* Historical overview of the Bion project // J. Gravit. Physiol. 2000. V. 7. № 1. P. S1–S8.

25. *Kurtz T.W.* Recommendations for Blood Pressure Measurement in Humans and Experimental Animals: P. 2: Blood Pressure Measurement in Experimental Animals: A Statement for Professionals From the Subcommittee of Professional and Public Education of the American Heart Association Council on High Blood Pressure Research // Hypertension. 2005. V. 45. № 2. P. 299–310.

26. *Makowiecki K., Hammond G., Rodger J.* Different Levels of Food Restriction Reveal Genotype-Specific Differences in Learning a Visual Discrimination Task // PLoS ONE. 2012. V. 7. № 11. P. e48703.

27. *Malkki H.A.I.* Appetitive operant conditioning in mice: heritability and dissociability of training stages // Front. Behav. Neurosci. 2010. V. 4. P. 171.

28. *Masini M.A., Albi E., Barmo C. et al.* The Impact of Long-Term Exposure to Space Environment on Adult Mammalian Organisms: A Study on Mouse Thyroid and Testis // PLoS ONE. 2012. V. 7. № 4. P. e35418.

29. *Maurissen J.P.J., Marable B.R., Andrus A.K., Stebbins K.E.* Factors affecting grip strength testing // Neurotoxicol. and Teratol. 2003. V. 25. № 5. P. 543–553.

30. *Pecaut M.J., Nelson G.A., Peters L.L. et al.* Genetic models in applied physiology: selected contribution: effects

of spaceflight on immunity in the C57/bl6 mouse. I. Immune population distributions // J. Appl. Physiol. 2003. V. 94. № 5. P. 2085–2094.

31. *Rogers D., Peters J., Martin J. et al.* SHIRPA, a protocol for behavioral assessment: validation for longitudinal study of neurological dysfunction in mice // Neurosci. Lett. 2001. V. 306. P. 89–92.

32. *Schneider I., Tirsch W.S., Faus-Keßler T. et al.* Systematic, standardized and comprehensive neurological phenotyping of inbred mice strains in the German Mouse Clinic // J. Neurosci. Meth. 2006. V. 157. № 1. P. 82–90.

33. *Shlyk G.G., Shirvinskaya M.A., Stekolin I.Y. et al.* General and special training of rhesus monkeys flown on Bion biosatellites // J. Gravit. Physiol. 2000. V. 7. № 1. P. S75–S9.

34. The Neurolab Spacelab mission: neuroscience research in space: results from the STS-90, Neurolab Spacelab mission. National Aeronautics and Space Administration, Lyndon B. Johnson Space Center, Houston, 2003.

35. *Bogaert van M.J.V., Groenink L., Oosting R.S. et al.* Mouse strain differences in autonomic responses to stress // Genes Brain Behav. 2006. V. 5. № 2. P. 139–149.

36. *Van Loo P.L.P., Van Zutphen L.F.M., Baumans V.* Male management: coping with aggression problems in male laboratory mice // Lab. Animals. 2003. V. 37. № 4. P. 300–313.

37. *Wilson J.W., Ott C.M., Quick L. et al.* Media Ion Composition Controls Regulatory and Virulence Response of Salmonella in Spaceflight // PLoS ONE. 2008. V. 3. № 12. P. e3923.

Поступила 3.03.2014

EXPERIMENTAL STUDIES WITH MICE ON THE PROGRAM OF THE BIOSATELLITE BION-M1 MISSION

Andreev-Andrievsky A.A., Shenkman B.S., Popova A.S., Dolguikh O.N., Anokhin K.V., Soldatov P.E., Ilyin E.A., Sychev V.N.

Aviakosmicheskaya I Ekologicheskaya Meditsina (Russia). 2014. V. 48. № 1. P. 14–27

Purpose of the BION-M1 project was laying the evidence and technological basis for addressing the medical issues of future remote space exploration missions by humans. The program of researches with the use of mice was focused on elicitation of cellular and molecular mechanisms of the muscular, cardiovascular and immune reactions to extended exposure in microgravity. The comprehensive studies combined lifetime measurements with investigations of mice tissues and cells by dint of the cutting-edge morphological, biochemical and molecular biology techniques.

Males of mice C57/BL6 aged 4 to 5 months were chosen as the object of studies. They were distributed into the flight, ground control and two vivarium (laboratory control) groups and investigated immediately on return and after 7 days of readaptation. Some of the physiological functions were recorded throughout the flight.

To ensure wellbeing of the animals in the experiments and to enhance data quality, prior to launch the mice were specially trained so as to accommodate to the group living, eating space food, and in-flight stress factors. Those of the mice that were designated for lifetime investigations were tested and received training pre-launch.

Key words: biosatellite, microgravity, mice.

УДК 613.693+616-003.96:612.812.7

ИЗМЕНЕНИЕ СТРУКТУРЫ НОЧНОГО СНА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ СТРАТЕГИЙ АДАПТАЦИИ К УСЛОВИЯМ 520-СУТОЧНОЙ ИЗОЛЯЦИИ

Завалко И.М.[1], Боритко Я.С.[1], Ковров Г.В.[2], Виноходова А.Г.[1], Чекалина А.И.[1], Смолеевский А.Е.[1]

[1]Государственный научный центр Российской Федерации – Институт медико-биологических проблем Российской академии наук, Москва
[2]Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова
e-mail: ilrus@mail.ru

Целью данной работы явилось выявление взаимосвязи особенностей изменения сна с индивидуальными стратегиями адаптации к стрессовым условиям 520-суточной изоляции.

На основании психологического тестирования с применением мотивационных тестов и теста Люшера в интерпретации Л.Н. Собчик, данных методики «Зеркальный координограф» были выявлены группы с различными